



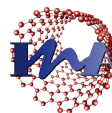
UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

TRABAJO FIN DE GRADO

Estudio de la liberación remota de fármacos mediante campos magnéticos alternos en polímeros termosensibles

Autor:
Pablo ORÚS

Director:
Gerardo F. GOYA



Instituto Universitario de Investigación
en Nanociencia de Aragón
Universidad Zaragoza

Departamento de Física de la Materia Condensada
Facultad de Ciencias
Instituto de Nanociencia de Aragón

Junio de 2016

Índice

1	Introducción	2
1.1	Magnetismo	2
1.2	Nanotecnología	3
1.3	Objetivos	4
2	Caracterización experimental	6
2.1	Distribución de tamaños	6
2.2	Absorción de potencia específica	8
2.3	Mínimo SPA medible	10
2.4	Ciclo de histéresis	12
3	Polímeros y fármacos	14
3.1	Concepto	14
3.2	Ensayos	15
3.2.1	Bloqueo de la relajación mecánica	15
3.2.2	Liberación de fármacos	16
4	Conclusiones	18
5	Métodos y procedimientos	19
5.1	Síntesis de PAA-MNPs por hidrólisis oxidativa	19
5.2	Determinación de la concentración por espectrofotometría	20
5.3	Liberación dinámica de fármacos	21
A	Siglas y abreviaturas	23
	Referencias	24

Capítulo 1

Introducción

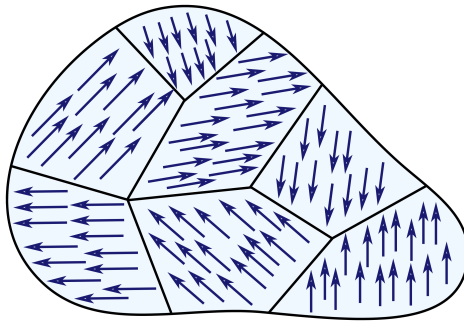
1.1 Magnetismo

Un sólido presenta propiedades magnéticas principalmente debido a los electrones de los átomos que lo constituyen. Estos electrones están dotados de un *momento magnético* que surge a partir de dos contribuciones: el momento angular orbital, o de rotación del electrón alrededor del núcleo; y el momento angular de espín, propiedad intrínseca de los electrones. Si los momentos magnéticos no se cancelan unos con otros en su totalidad, el átomo presenta un momento magnético total no nulo y se dice que se trata de un átomo magnético.

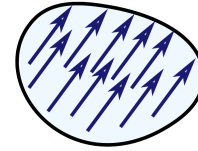
Dependiendo de la orientación relativa de los momentos magnéticos, el sistema presenta distintos tipos de comportamiento magnético. En el caso presente es de particular interés el análisis de materiales *ferromagnéticos*, caracterizados por una ordenación de los momentos magnéticos de forma paralela unos con otros. Ello permite la adición de unas contribuciones con otras, dotando al material de un momento magnético total susceptible de ser orientado mediante la aplicación de campos magnéticos externos. [1]

Aunque en principio cabría pensar que en un material ferromagnético todos los momentos magnéticos están orientados en la misma dirección, en la naturaleza esto no ocurre así dado que, en esa disposición, la energía magnética almacenada en el sistema no es la mínima posible. El sistema tiende a organizarse en configuraciones energéticamente más favorables, consistentes en la separación del material en varios *dominios* o regiones donde los momentos magnéticos se orientan en la misma dirección. Esta distribución se muestra esquemáticamente en la figura 1.1(a). El momento magnético total surge como suma de las contribuciones de los distintos dominios que constituyen el material.

Sin embargo, cuando el volumen del material se reduce por debajo de un determinado valor crítico, la separación en dominios deja de ser una disposición energéticamente favorable (ya que existe almacenamiento de energía en las paredes que



(A) Configuración en varios dominios.



(B) Configuración en un único dominio.

FIGURA 1.1: Disposiciones de los momentos magnéticos.

separan dominios), y los todos los momentos se orientan en la misma dirección. En esta configuración, denominada *monodominio*, el sistema se comporta como un único momento magnético, tal y como se muestra en la figura 1.1(b).

La existencia de una dirección privilegiada en el espacio a lo largo de la cual los momentos magnéticos se orientan dota al material de una propiedad denominada *anisotropía magnética*. Asociada a esta propiedad existe una energía, correspondiente a girar el momento magnético en relación a la dirección privilegiada. Esta energía puede entenderse como una barrera de potencial que separa los dos estados de mínima energía, correspondientes a la orientación paralela o antiparalela de los momentos magnéticos en relación al eje.

El paso de un estado a otro, o *relajación* de la partícula, se relaciona con la superación de la barrera de potencial y se debe principalmente al efecto de la energía térmica, $k_B T$, relevante a temperatura ambiente. La relajación magnética ocurre principalmente a través de dos mecanismos: la *relajación de Néel*, correspondiente a la rotación del momento magnético respecto a los ejes cristalinos del sistema; y la *relajación de Brown*, relacionada con la rotación mecánica de la partícula como un todo y correspondiente a la rotación física del sistema en una u otra dirección. Para que esta rotación física pueda tener lugar, el sistema debe estar situado en un medio que lo permita, por ejemplo, en una disolución. [2]

1.2 Nanotecnología

La conocida charla *Al fondo hay sitio* impartida por el físico estadounidense Richard Feynman (1918-1988) en el Instituto Tecnológico de California en 1959 supuso el despegue de lo que actualmente se conoce como *nanotecnología*. La nanotecnología puede definirse como el conjunto de técnicas y aplicaciones relacionadas con la

fabricación y manipulación de materiales en el rango de 1 a 100 nm ($1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$). [3]

Las ideas sobre magnetismo presentadas en la sección anterior cobran aplicación práctica dentro del marco de la nanotecnología: dado que el volumen crítico necesario para que el sistema presente un único dominio magnético cae dentro del rango de dimensiones correspondiente a estas técnicas, cabe plantearse la síntesis artificial de *nanopartículas magnéticas* (MNPs) que presenten estas propiedades. Efectivamente, tal fabricación es experimentalmente alcanzable y relativamente sencilla, lo cual abre la puerta a toda una línea de desarrollo basada en el nanomagnetismo.

En particular, el punto de interés de este trabajo reside en la aplicación práctica del fenómeno conocido como **hipertermia magnética**. [4] Aplicando un campo magnético alterno de radiofrecuencia (3 Hz - 300 GHz), perteneciente a la región no ionizante del espectro electromagnético, es posible inducir mecanismos de relajación en MNPs dispersas en un coloide y ocasionar una *absorción de potencia* por parte de éstas. La energía absorbida es posteriormente liberada en forma de calor al medio, aumentando la temperatura de éste.

La hipertermia magnética presenta aplicaciones de interés en el campo de la biomedicina: el calentamiento específico de determinadas regiones puede utilizarse, entre otros, para la ablación térmica de células tumorales o para la liberación remota de fármacos en localizaciones definidas. [5] En particular este trabajo versa sobre la segunda aplicación: creando una matriz polimérica o *ferrogel* constituida por un polímero termosensible y MNPs e introduciendo el fármaco en él, la aplicación de un campo magnético de radiofrecuencia ocasiona el calentamiento del sistema, induciendo cambios conformacionales en la estructura del polímero y la causando la liberación del fármaco. [6] Trasladando estos conceptos al marco oncológico, si se introduce el ferrogel en la región de interés, la liberación del fármaco por hipertermia permitiría distribuir éste única y exclusivamente en la zona afectada, evitando así los daños colaterales que tienen lugar cuando el fármaco se aplica al organismo completo. Ello abre la puerta a eliminar los efectos secundarios indeseados que aparecen como consecuencia de otros tratamientos más agresivos tales como la quimioterapia o la radioterapia.

1.3 Objetivos

En este trabajo se ha abordado la síntesis de nanopartículas magnéticas compuestas de magnetita, Fe_3O_4 , como agentes de calentamiento en una matriz polimérica termosensible de poli(N-isopropilacrilamida) (PNIPAM) y alginato (Alg). Este material compuesto ha sido diseñado para su utilización como sistema liberador de

fármacos bajo la acción remota de un campo magnético alterno.

Para comprender el mecanismo que gobierna dicha liberación se han estudiado los procesos de relajación magnética mediante medidas de absorción de potencia en los coloides de partida, así como en el complejo polimérico.

Dentro de este marco general, los objetivos específicos han sido:

1. La síntesis de nanopartículas magnéticas de magnetita con recubrimiento de ácido poliacrílico (PAA).
2. La fabricación de muestras poliméricas de PNIPAM+Alg con MNPs incorporadas como nanocalentadores.
3. La caracterización de la absorción de potencia específica (SPA) de las MNPs y de la respuesta térmica del complejo termosensible.
4. La realización de una prueba de concepto utilizando como molécula liberada la vitamina B12, utilizando un sistema de inducción magnética acoplado con un detector espectrofotométrico.

En los capítulos siguientes se detallan los resultados y la discusión de las actividades correspondientes a dichos objetivos de trabajo. Los detalles sobre procesos experimentales que requieren una explicación aparte se incluyen en el capítulo 5; y una lista de abreviaturas utilizadas a lo largo del trabajo se presenta en el apéndice A.

Capítulo 2

Caracterización experimental

Tal y como se mencionó en la introducción, el material de trabajo de partida para el presente estudio es un coloide (con agua como solvente) de MNPs de magnetita (Fe_3O_4) dotadas de un recubrimiento de ácido poliacrílico (PAA). Este polímero, de elevado peso molecular y fórmula química $(\text{C}_3\text{H}_4\text{O}_2)_n$ causa al adherirse a las MNPs que éstas adquieran una forma aproximadamente esférica. Esto lo diferencia de otros polímeros como la polietilenimina o PEI, también de uso extendido en la síntesis de MNPs.

El método de síntesis de las MNPs recibe el nombre de *hidrólisis oxidativa* y se encuentra descrito con detalle en la literatura y en el capítulo 5. Una vez se dispone de la muestra, es necesario obtener experimentalmente sus características físicas de interés, en este caso relacionadas principalmente con su comportamiento magnético.

2.1 Distribución de tamaños

La capacidad de las MNPs de absorber potencia bajo un campo magnético alterno guarda relación con su tamaño. Para obtener información acerca del tamaño de las partículas, se toman fotografías de la muestra por *microscopía electrónica de transmisión* (TEM). El motivo de utilizar electrones como sonda reside en que el tamaño de las partículas es inferior a la longitud de onda de la luz visible. La figura 2.1 muestra dos imágenes típicas a escalas diferentes.

Utilizando el software *ImageJ* se efectúa un conteo de un total de 1000 partículas, entendiendo como “tamaño”, d , a la distancia medida entre los extremos de la partícula. Dada que algunas presentan formas con distintas posibles distancias a medir, se toma como medida en este caso una distancia promedio, entre la mayor y la menor.

El histograma de la figura 2.2 muestra la distribución de tamaños obtenida, superpuesta con una distribución log-normal. Se aprecia un buen acuerdo entre los

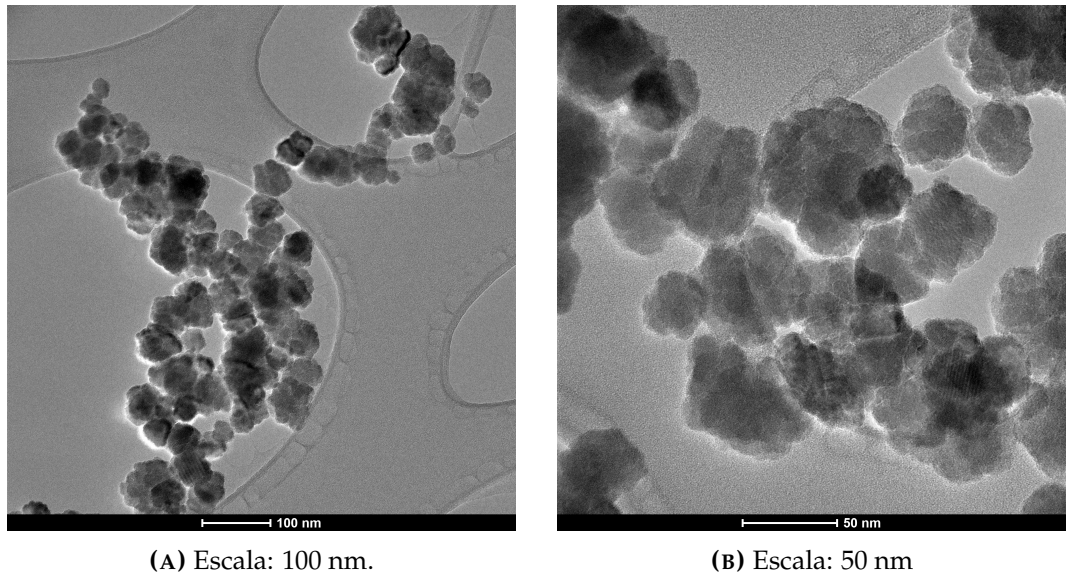


FIGURA 2.1: Imágenes por TEM de la muestra.

resultados y esta distribución, de la cual puede extraerse el tamaño de las MNPs. En particular, se deduce un valor de $\langle d \rangle = 37.1 \pm 0.5$ nm.

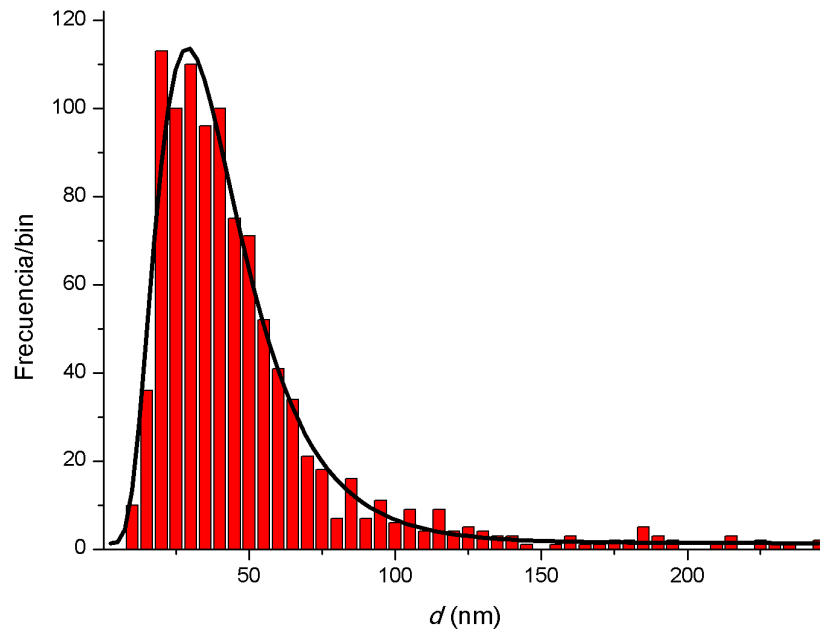


FIGURA 2.2: Distribución de tamaños de la muestra ajustada a una distribución log normal. 1 bin = 5 nm.

2.2 Absorción de potencia específica

En la caracterización de la capacidad de las MNPs para calentar el medio, la magnitud clave es la *absorción de potencia específica* o SPA. [7] El SPA de un coloide magnético permite obtener la capacidad de calentar de éste en determinadas condiciones de amplitud y frecuencia de campo externo. Viene dado por la siguiente relación calorimétrica:

$$SPA = \frac{m_{NP}c_{NP} + m_1c_1}{m_{NP}} \left(\frac{\Delta T}{\Delta t} \right)_{\text{máx}} \quad (2.1)$$

m_{NP} es la masa de las nanopartículas, m_1 es la masa de solvente, y c_{NP} y c_1 son las capacidades caloríficas de las MNPs y el solvente, respectivamente. El último factor corresponde al máximo ritmo de calentamiento de la muestra, es decir, el cambio en la temperatura como función del tiempo evaluado en el punto de máxima pendiente. Es posible expresar esta relación en función de parámetros directamente medibles en el laboratorio y constantes conocidas:

$$SPA = \frac{\delta_1 c_1}{\phi} \left(\frac{\Delta T}{\Delta t} \right)_{\text{máx}} \quad (2.2)$$

δ_1 y c_1 son, respectivamente, la densidad y calor específico del solvente. Como en la muestra utilizada el solvente es agua, se tiene $\delta_1 = 1 \text{ g/l}$ y $c_1 = 4.18 \text{ J/g}$. ϕ representa la concentración de la muestra, definida como m_{NP}/V_1 siendo V_1 el volumen total de coloide, y m_{NP} la masa total de nanopartículas. Es por tanto necesario determinar en el laboratorio los valores del ritmo de cambio y de la concentración.

La concentración del coloide se determina por espectrofotometría. Los detalles de la técnica se incluyen en el capítulo 5.

El resultado obtenido es de $[\text{Fe}_3\text{O}_4] = 2.04 \pm 0.16 \text{ mg/ml}$ para el coloide sintetizado. La incertidumbre se ha obtenido por propagación de errores, teniendo en cuenta la desviación estadística en las medidas de densidad óptica y la incertidumbre en la curva de calibración de la que se dispone.

Por otra parte, el ritmo de calentamiento máximo se mide haciendo uso del equipo DM100 (nB Nanoscale Biomagnetics, S.L.) del que se dispone en el laboratorio, diseñado para ello. En este equipo se introduce un vial con aproximadamente 1 ml de muestra, y utilizando una fibra óptica se mide la variación de temperatura de la muestra cuando ésta es sometida a un campo magnético alterno, cuya frecuencia e intensidad son controlables por el usuario. El equipo dispone de un sistema de refrigeración y cámara de vacío que permiten aislar térmicamente la muestra, reduciendo así las pérdidas o contribuciones ambientales a la temperatura de la

muestra.

Para medir la magnitud deseada, se fija la frecuencia del campo a 571 kHz y se toman medidas para distintos valores de intensidad del campo. Tras una termalización previa de la muestra, las medidas se realizan durante 5 minutos o hasta que la muestra alcanza 50°C de temperatura; lo que ocurra antes. Esta restricción en la temperatura máxima se lleva a cabo dado que, para campos intensos, las muestras calientan muy rápidamente y podrían hervir en el interior del vial, lo cual alteraría su concentración y falsearía la medida (además de suponer una inconveniencia notable para el equipo). El calentamiento de la muestra presenta una tendencia asintótica hacia una temperatura máxima, produciéndose la máxima variación al principio de ésta. Se toman tres medidas para cada valor de campo y se ajusta a una recta la zona inicial de la curva $T(t)$ obtenida (siempre correspondiente a la zona de máxima pendiente), y se deduce un valor de $(\Delta T)/(\Delta t)$ máximo con su incertidumbre asociada para cada punto. La figura 2.3 muestra un resultado típico.

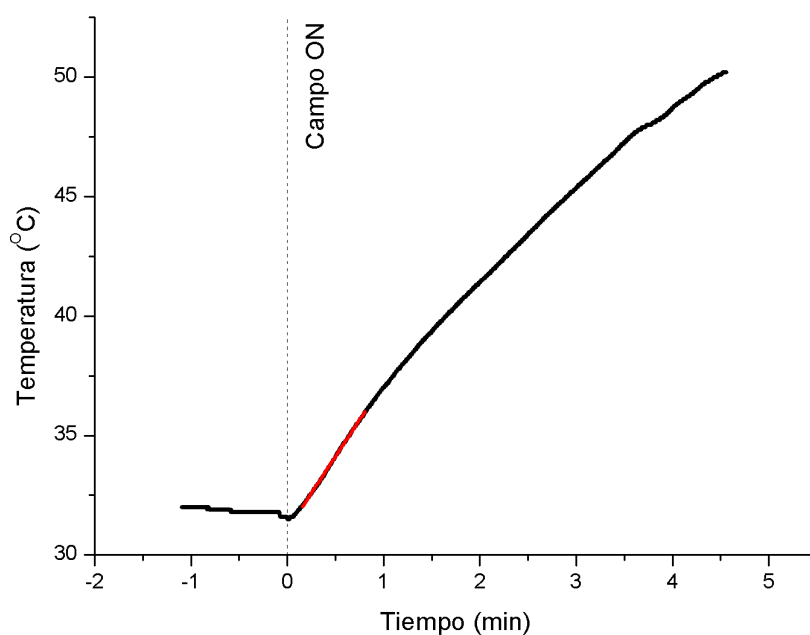


FIGURA 2.3: Patrón típico de calentamiento. $H = 19$ kA/m a partir de $t = 0$ min. Se muestra la región ajustada para determinar dT/dt máxima.

Haciendo uso de la ecuación 2.2 se obtiene el valor del SPA para distintos valores de campo, siempre a $f = 517$ kHz. La gráfica de la figura 2.4 muestra los resultados obtenidos ajustados a una ecuación potencial de la forma $\text{SPA} \propto H^\lambda$.

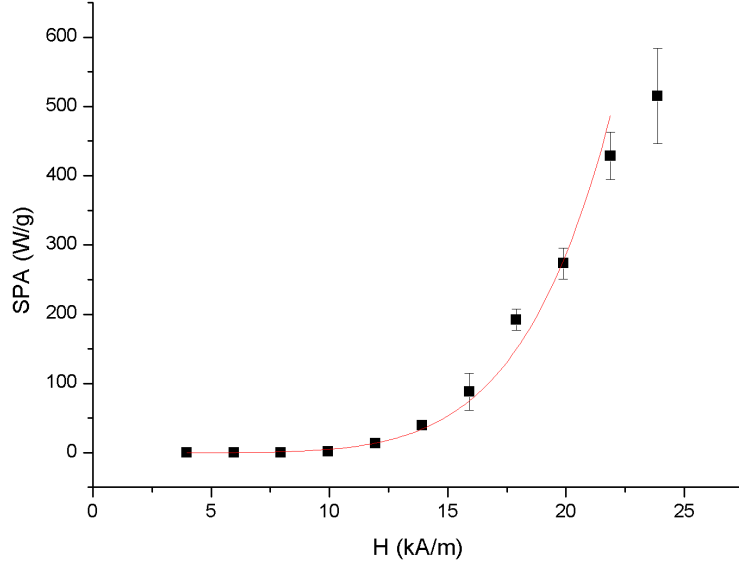


FIGURA 2.4: SPA como función de H . Ajuste a $SPA = cH^\lambda$ (c , λ , parámetros de ajuste).

Se deduce un valor de $\lambda = 5.9 \pm 0.3$. Este valor de λ se aparta notablemente del resultado de la teoría de respuesta lineal (LRT), que indica $\lambda \sim 2$. [8] [9] Esta discrepancia sugiere que el campo de anisotropía de las MNPs, H_k , es del orden de los valores máximos de campo aplicado, $H_0 = 24$ kA/m.

En el ajuste no se ha incluido el último punto, tanto por alejarse de la tendencia potencial como por presentar una incertidumbre muy alta, que puede asociarse a que, dado que 24 kA/m es el valor máximo de H que suministra el equipo, el valor presenta fluctuaciones importantes a lo largo de la medida.

2.3 Mínimo SPA medible

Se puede considerar que el mínimo SPA medible por el equipo corresponde al valor mínimo de la incertidumbre asociada a las medidas que se realicen con éste. Esto es, cualquier medida cuyo valor esté por debajo de dicha incertidumbre quedará oculta por ésta y por tanto carecerá de validez.

Se acepta la expresión utilizada anteriormente para el SPA, dada por la relación 2.2. Teniendo en cuenta que la derivada es, en sí misma, un número y no una función (para cada valor del campo), se alivia la notación llamándola $\theta \equiv (\Delta T / \Delta t)_{\text{máx}}$.

Siguiendo la relación indicada, existen en la definición del SPA *dos* variables que se miden en el laboratorio y están, por tanto, sujetas a incertidumbre experimental: la concentración ϕ y el ritmo de calentamiento θ . Se acepta que δ_1 y c_1 son constantes conocidas con incertidumbre despreciable en comparación con la que tienen las otras variables.

La teoría de errores indica que dada una función $f(a, b)$, función de dos variables no correlacionadas a y b sujetas a incertidumbres σ_a y σ_b , la incertidumbre final asociada a f , σ_f , es

$$\sigma_f^2 = \left(\frac{\partial f}{\partial a} \right)^2 \sigma_a^2 + \left(\frac{\partial f}{\partial b} \right)^2 \sigma_b^2 \quad (2.3)$$

Aplicando la expresión anterior al caso del SPA, identificando a con ϕ y b con θ , se encuentra que *la incertidumbre asociada al SPA* es:

$$\sigma_{\text{SPA}} = \sqrt{\left(\frac{\delta_1 c_1}{\phi} \right)^2 \sigma_\theta^2 + \left(\frac{-\delta_1 c_1 \theta}{\phi^2} \right)^2 \sigma_\phi^2} = \frac{\delta_1 c_1}{\phi} \sqrt{\sigma_\theta^2 + \frac{\theta^2}{\phi^2} \sigma_\phi^2} \quad (2.4)$$

Llegados a este punto, corresponde tomar decisiones sobre qué magnitudes van a prevalecer sobre otras. En el caso presente se intenta caracterizar el instrumento de medida del ritmo de calentamiento, así que tiene sentido desvincularse, en mayor o menor medida, de la incertidumbre en la determinación de la concentración, que se obtiene por espectrofotometría.

Dos posibles opciones son:

1. Considerar σ_ϕ como una constante conocida. En ese caso, la incertidumbre en el SPA viene totalmente dada por la expresión anterior, teniendo en cuenta que depende del ritmo de calentamiento en cada punto.
2. Considerar $\sigma_\phi = 0$ para los propósitos prácticos.

Aunque en el sentido más estricto de la palabra, la primera opción parece más fiable, la segunda tiene significado en la caracterización del instrumento. No es particularmente acertado incluir fuentes de incertidumbre externas en la caracterización de un instrumento, ya que son totalmente ajenas a ésta.

Si se acepta $\sigma_\phi = 0$ (lo cual será una aproximación válida si el análisis espectrofotométrico se realiza con suficiente precisión), entonces la incertidumbre en el SPA puede simplificarse a

$$\sigma_{\text{SPA}} \cong \frac{\delta_1 c_1}{\phi} \sigma_\theta \quad (2.5)$$

Esta expresión corresponde, siguiendo la teoría propuesta al inicio, al *mínimo valor medible del SPA*. Valores de SPA ($SPA \pm \sigma_{SPA}$) por debajo de este valor quedan ocultos por la incertidumbre y no pueden considerarse válidos. Nótese que es directamente proporcional a la densidad y calor específico de la muestra, e inversamente proporcional a la concentración del coloide: un coloide más concentrado permite medir, con el mismo equipo, valores más pequeños de SPA.

El valor que queda por determinar es el de σ_θ , correspondiente a la incertidumbre en la determinación del ritmo de calentamiento. Esta incertidumbre presenta principalmente dos fuentes: la calidad del ajuste de los puntos experimentales a una recta que se realice para obtener el valor de θ ; y la fluctuación estadística existente entre las distintas medidas.

2.4 Ciclo de histéresis

La caracterización magnética del coloide se lleva a cabo utilizando un magnetómetro de muestra vibrante (VSM), mediante el cual se reproduce un ciclo de histéresis completo a una cantidad conocida de coloide.

La figuras 2.5 y 2.6 muestran las curvas obtenidas, donde los datos se han normalizado a la masa de magnetita de la muestra. Se deducen los siguientes parámetros característicos:

Magnetización de saturación	$73 \pm 6 \text{ Am}^2/\text{kg}$
Magnetización remanente	$19 \pm 2 \text{ Am}^2/\text{kg}$
Campo coercitivo	$\sim 6 \text{ kA/m}$

TABLA 2.1: Parámetros magnéticos de la muestra.

Se observa también que el área contenida en el interior de la curva central es distinta de cero (figura 2.6). Ello es un indicativo de que las MNPs no se encuentran totalmente en configuración monodominio.

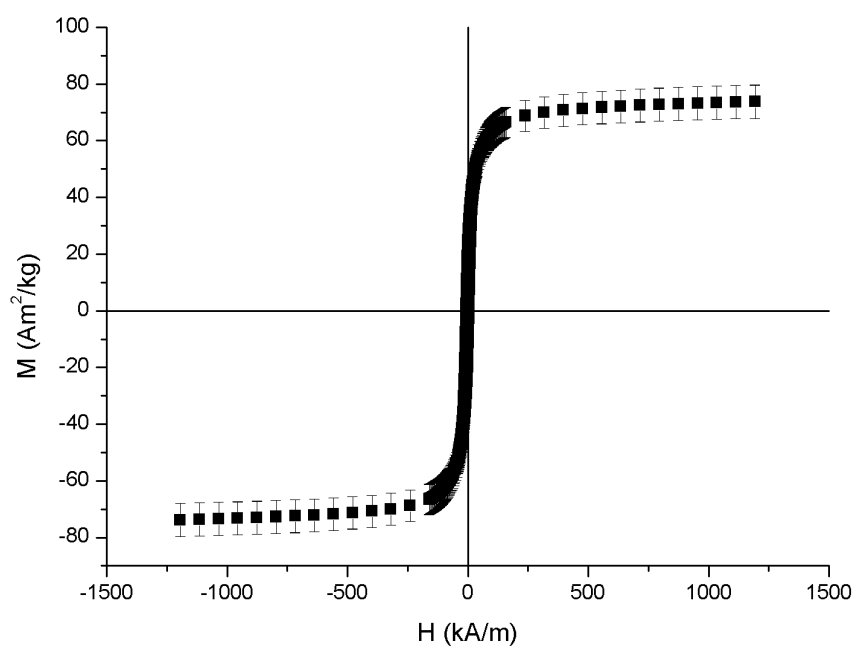


FIGURA 2.5: Ciclo de histéresis completo.

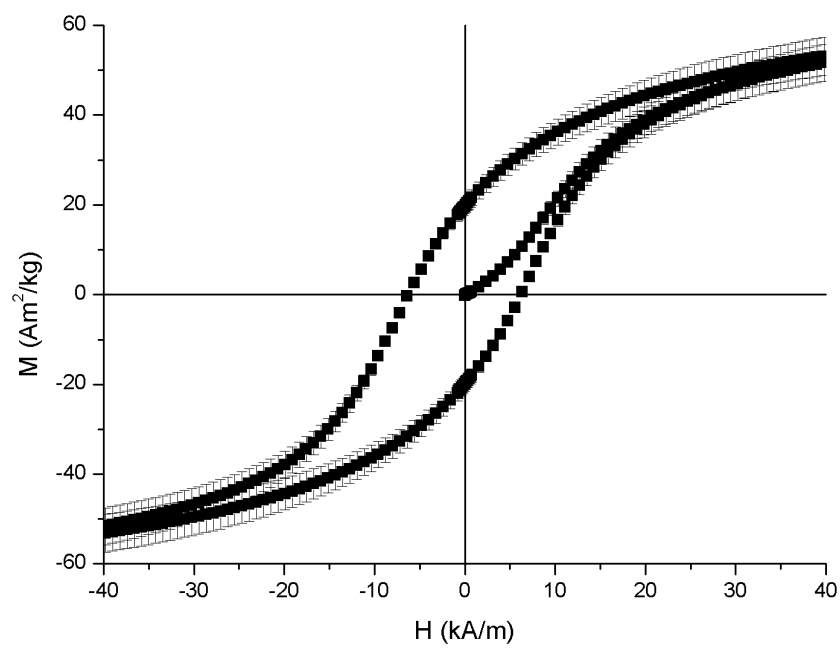


FIGURA 2.6: Detalle.

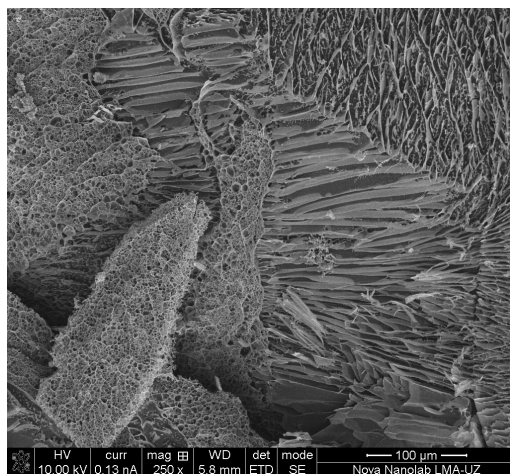
Capítulo 3

Polímeros y fármacos

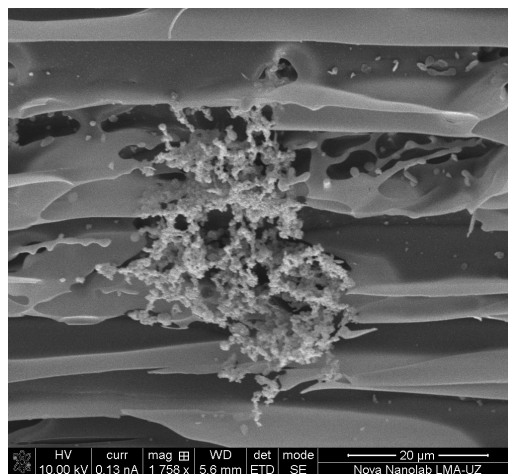
3.1 Concepto

Habiendo caracterizado las MNPs, que actuarán como nanocalentadores, se procede a sintetizar el gel magnético que se empleará para liberar el fármaco. El ferrogel se constituye a partir de dos polímeros: poli(N-isopropilacrilamida) o PNIPAM; y alginato, que dota de consistencia mecánica a la muestra.

El PNIPAM es un polímero termosensible, que se caracteriza por presentar un cambio estructural a una temperatura cercana a los 30° C. Al alcanzar esta temperatura, el polímero se contrae liberando toda el agua acumulada en el interior del gel. El proceso es reversible: si se deja enfriar, el complejo se rehidrata absorbiendo agua y regresa a su conformación original.



(A) Polímeros. Escala: 100 μm .



(B) MNPs. Escala: 20 μm .

FIGURA 3.1: Imágenes por FIB-SEM del gel.

Este polímero se utiliza para sintetizar *hidrogeles*. Un hidrogel es un gel que contiene una gran cantidad de agua (generalmente 80% o más) constituido por redes

poliméricas compatibles con el agua. Los materiales poliméricos de PNIPAM son por tanto típicos hidrogeles sensibles a la temperatura, que exhiben una transición crítica a bajas temperaturas (LCST). [10]

Mezclando el hidrogel con el coloide se obtiene el gel magnético, de consistencia viscosa y claramente separado del agua de la disolución en el vial de ensayo. En la figura 3.1 se muestran imágenes obtenidas por microscopía FIB-SEM (haz iónico focalizado y electrónica de barrido). Se aprecian las estructuras del PNIPAM y del alginato, así como las MNPs inmersas en la matriz.

La idea para liberar fármacos consiste en introducir éstos en el interior del gel disueltos en agua e inducir posteriormente el cambio conformacional utilizando hipertermia magnética, de la misma forma que se indicó en la sección anterior. La figura 3.2 muestra este concepto.

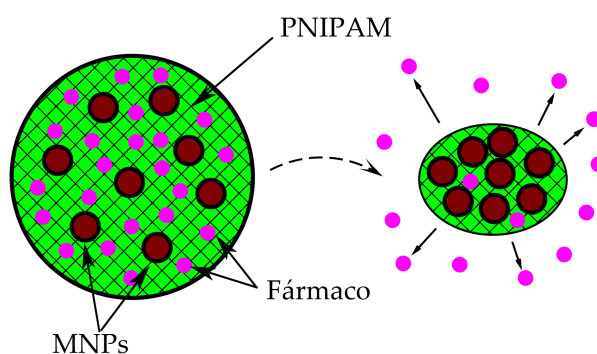


FIGURA 3.2: Liberación remota de fármacos por hipertermia magnética.

3.2 Ensayos

3.2.1 Bloqueo de la relajación mecánica

El primer ensayo que se lleva a cabo con los geles de Alg+PNIPAM es el de hipertermia magnética en el DM. En particular, se extraen cantidades conocidas de magnetita del coloide mediante centrifugación y extracción del sobrenadante, que se utilizan para preparar parejas de muestras. Una muestra de cada pareja se rediluye en agua mili-Q, mientras que a la otra se le añaden los polímeros (500 μ l de la disolución de Alg+PNIPAM de la que se dispone) y CaCl_2 (100 μ l) como agente entrecruzante. Cada pareja se enrasa al mismo volumen final utilizando agua mili-Q.

La gráfica 3.3 muestra los resultados de cada pareja, todos ellos realizados en condiciones de $H = 20 \text{ kA/m}$ y $f = 571 \text{ kHz}$. En el eje vertical se muestra la variación máxima en la tasa de calentamiento.

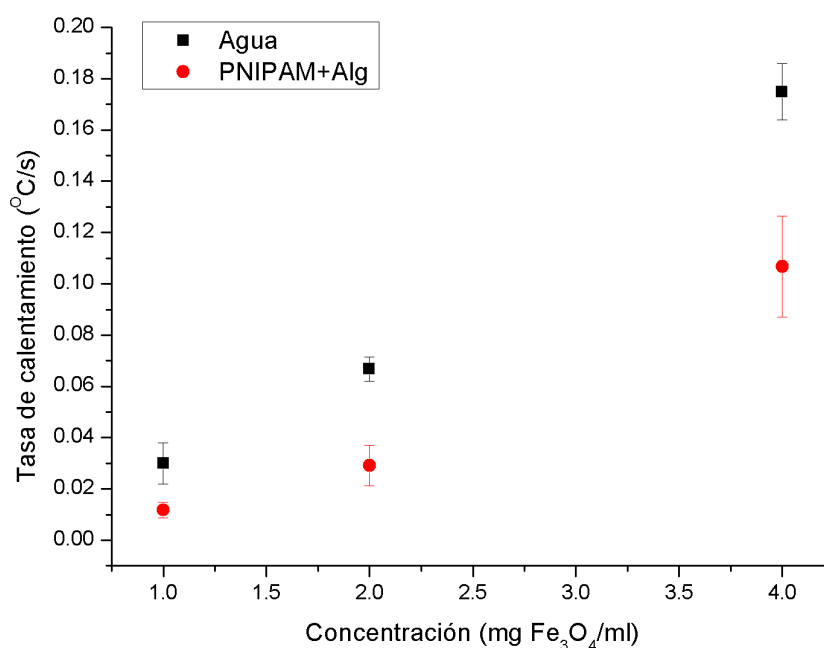


FIGURA 3.3: Tasa de calentamiento en función de la masa de magnetita.

De los resultados de la figura 3.3 puede extraerse la conclusión de que cuando las MNPs están inmersas en el gel, el mecanismo de relajación mecánica se encuentra bloqueado: la presencia de los polímeros impide que las nanopartículas roten físicamente en la disolución. Sin embargo, la relajación de Néel todavía tiene lugar y en consecuencia las MNPs continúan absorbiendo potencia y calentando el sistema.

Por tanto y pese a que la tasa de calentamiento sea inferior, las MNPs con Alg+PNIPAM pueden utilizarse en un proceso de hipertermia magnética para inducir la transición de fase del polímero termosensible.

3.2.2 Liberación de fármacos

El compuesto utilizado como fármaco inerte para la prueba de concepto es la vitamina B12. La principal ventaja que presenta la vitamina B12 para este ensayo (aparte de su hidrosolubilidad) es que presenta un pico de absorción luminosa en 550 nm. Ello permite determinar la concentración de vitamina B12 en una determinada disolución mediante el uso de técnicas espectrofotométricas, de forma

análoga a la forma en que se determinó la concentración de coloide utilizando tio-cianatos.

Esta prueba de concepto difiere de las que se habitualmente se realizan en este campo de investigación en que se lleva a cabo de forma *dinámica*. El objetivo es medir con un espectrofotómetro las variaciones en la absorbancia a 550 nm de un flujo continuo de agua en el que previamente al paso por el haz de luz se dispone el ferrogel que libera la vitamina B12. Los detalles sobre el montaje y su funcionamiento se encuentran en el capítulo 5.

Tras conectar el flujo del agua y alcanzar estabilidad, se induce el cambio conformacional en la matriz PNIPAM+Alg mediante la aplicación de un campo magnético y se registran los valores de absorbancia en función del tiempo. La gráfica 3.4 muestra, para una muestra de ferrogel con 6 mg de magnetita, la evolución de la absorbancia en función del tiempo, donde el instante $t = 0$ s se identifica con el momento de aplicación del campo magnético, de parámetros $H = 24$ kA/m y $f = 550$ kHz.

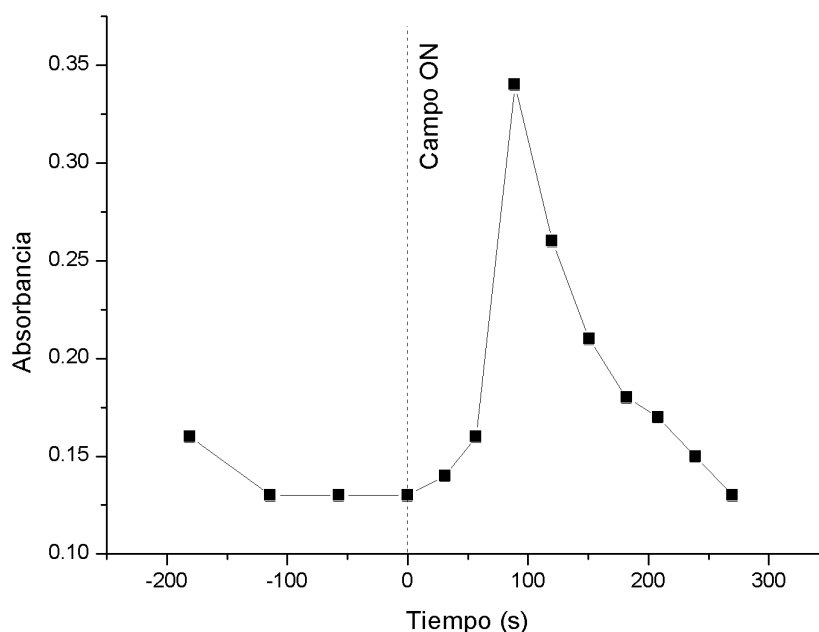


FIGURA 3.4: Absorbancia en función del tiempo. $H = 24$ kA/m ($f = 550$ kHz) a partir de $t = 0$ s.

Se aprecia claramente un aumento relativamente rápido de la absorbancia y, en consecuencia de la concentración, de acuerdo con el concepto de partida.

Capítulo 4

Conclusiones

A la vista de los resultados obtenidos en los sucesivos ensayos y experimentos realizados en el trabajo, pueden extraerse las siguientes conclusiones:

- El método de síntesis de PAA-MNPs por reducción oxidativa es eficiente y repetible, como ya se había corroborado en la literatura. Este método permite obtener nanopartículas magnéticas de tamaños del orden de decenas de nm.
- El SPA de estas partículas depende de la intensidad de campo aplicado con una dependencia del tipo H^λ , para valores de campo de entre 0 y 20 kA/m, con $\lambda = 5.9 \pm 3$. Este valor se aparta de lo esperado por la LRT ($\lambda = 2$).
- La utilización combinada de los polímeros PNIPAM+Alg permite obtener un ferrogel consistente en el cual pueden introducirse las partículas. La tasa de calentamiento se reduce cuando las MNPs se introducen en esta matriz como consecuencia del bloqueo de la relajación mecánica.
- El complejo PNIPAM+Alg puede absorber y retener la vitamina B12 en su interior. Aplicando un campo magnético alterno de suficiente intensidad se induce un cambio conformacional en la estructura del polímero causado por el aumento de la temperatura que se traduce en la liberación del fármaco.

Los resultados son por tanto, positivos y esperanzadores: la técnica de liberación remota de fármacos con MNPs en PNIPAM+Alg funciona, al menos en sus primeras fases. Entre las metas a corto plazo puede destacarse el diseño de un montaje experimental compacto capaz de medir simultáneamente campo, temperatura, absorbancia y concentración; así como de trabajar en condiciones de circuito cerrado.

Estos resultados indican que la liberación remota de fármacos mediante hipertermia representa una prometedora línea de investigación para futuros desarrollos que podrían alcanzarse en un futuro próximo.

Capítulo 5

Métodos y procedimientos

5.1 Síntesis de PAA-MNPs por hidrólisis oxidativa

La preparación de nanopartículas recubiertas de PAA se lleva a cabo mediante un proceso de hidrólisis oxidativa o precipitación de una sal de hierro en medio básico con un agente oxidante. [11]

Esta síntesis se lleva a cabo a partir de dos disoluciones:

- (a) 0.487 g de NaOH y 1.364 g de KNO_3 en 135 ml de agua mili-Q.
- (b) 0.308 g de PAA, 0.308 de $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ y 8.3 μl de H_2SO_4 en 15 ml de agua mili-Q.

La disolución (a) se prepara en un matraz de cuarzo con tres cuellos, que es el que se utilizará para la síntesis final. Tras añadir todos los reactivos, se agita mecánicamente a 50 rpm a través del cuello central (ver figura 5.1) y se le añade un flujo burbujeante de N_2 por el cuello izquierdo.

La disolución (b) se prepara en un vaso de precipitados pequeño añadiendo en primer lugar únicamente el PAA. Este polímero tarda un cierto tiempo en disolverse, por lo que se acelera su disolución utilizando un agitador magnético. Cuando el PAA está disuelto, se añaden el hierro y el ácido y se vierte la disolución completa al matraz de tres cuellos.

Cuando ambas disoluciones están mezcladas en el matraz, se añade un tubo refrigerante con un flujo de agua para prevenir la evaporación y se retira el flujo burbujeante, dejándolo en una ventilación simple sin contacto directo con la disolución. Se añade también un termómetro para controlar la temperatura de la muestra. Este montaje se muestra en la figura 5.1.

Transcurridos 20 minutos, el matraz se calienta mediante una placa calefactora a 90°C . La muestra no debe superar esta temperatura. A las tres horas, se retira el flujo de nitrógeno y el sistema se deja reaccionar.

A las 24 horas el sistema se retira y se procede a la limpieza de las partículas. Mediante decantación magnética se retira el exceso de disolvente y se sustituye éste por agua mili-Q repitiendo el proceso 3-4 veces hasta obtener un coloide “limpio”.

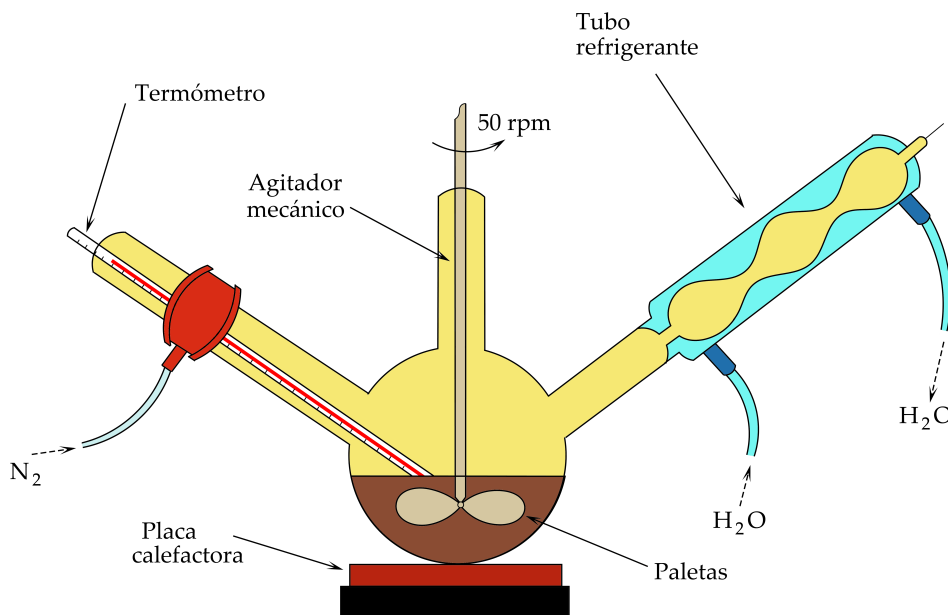
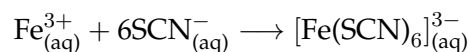


FIGURA 5.1: Esquema del montaje para la síntesis.

5.2 Determinación de la concentración por espectrofotometría

La determinación de la concentración de masa magnética (magnetita) en el coloide se lleva a cabo mediante el análisis espectrofotométrico de un pico de absorción característico del ión tiocianato (SCN^-) a 478 nm. En primer lugar se lleva a cabo una digestión química de la magnetita diluyendo una cantidad conocida de coloide (100 μl) en 500 μl de ácido clorhídrico (HCl) 6M y ácido nítrico (HNO_3) al 65%. La acción de estos ácidos separa los iones de hierro del complejo de la magnetita, haciendo que la preparación adquiera un color amarillo brillante a las pocas horas.

Cuando la digestión se ha completado, esta disolución se lleva a 10 ml con HCl 6M. Paralelamente se prepara una disolución de tiocianato de potasio, KSCN, 1.5M. Al mezclar estas dos disoluciones tiene lugar la reacción de complejación de tiocianato,



Se prepara también una disolución auxiliar de 0.5 ml HNO_3 con HCl 6M. 500 μl de esta disolución se mezclan con 500 μl de la disolución de KSCN para crear una muestra “blanca” con la que situar el cero del espectrofotómetro a 478 nm. Posteriormente, se introduce una muestra de 200 μl de la disolución de coloide, 300 μl de HCl y 500 μl de la disolución de KSCN. Esta muestra adquiere color rojizo debido a la formación del complejo $\text{Fe}(\text{SCN})_6^{3-}$. Midiendo valores de absorbancia a 478 nm y comparando con una recta de calibración previamente realizada, se obtiene el valor de la concentración de hierro de la muestra.

Este valor se utiliza para obtener “calculando hacia atrás” la concentración de Fe_3O_4 en la muestra teniendo en cuenta las sucesivas diluciones realizadas y la cantidad de átomos de hierro presentes por molécula de magnetita.

5.3 Liberación dinámica de fármacos

Para llevar a cabo la prueba de concepto de liberación dinámica de fármacos se utiliza un montaje experimental basado en un instrumento DM acoplado a un espectrofotómetro. Un esquema cualitativo del mismo se muestra en la figura 5.2.

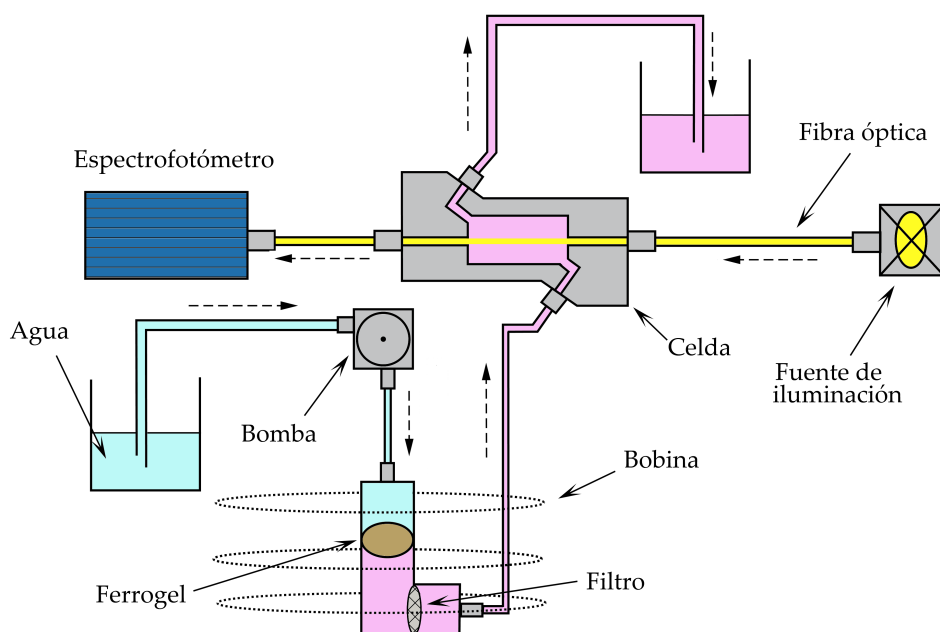


FIGURA 5.2: Esquema del montaje para la liberación dinámica.

El sistema está constituido por un circuito abierto a través del cual se hace circular agua, manteniendo un flujo lento. Este flujo se hace atravesar un portamuestras específicamente diseñado para ello introducido en la bobina de un medidor DM.

En dicho portamuestras se introduce el ferrogel de PNIPAM+Alg, sobre el que previamente (~ 24 h) se ha introducido la vitamina B12 en disolución acuosa.

Cuando se aplica el campo magnético sobre el portamuestras, se induce el cambio conformacional en el PNIPAM que resulta en la liberación de la vitamina B12, que se diluye en el flujo constante de agua. Este flujo atraviesa la celda del espectrofotómetro y es atravesado por un haz de luz guiado por fibra óptica, que posteriormente se recoge. Es posible extraer información sobre las variaciones en la concentración de vitamina B12 en el flujo de agua que constantemente está atravesando la celda si se estudia cómo varía en función del tiempo la densidad óptica en el pico característico de absorción de la vitamina B12, situado en $\lambda = 550$ nm. La gráfica de la figura 5.3 muestra un espectro típico de absorción.

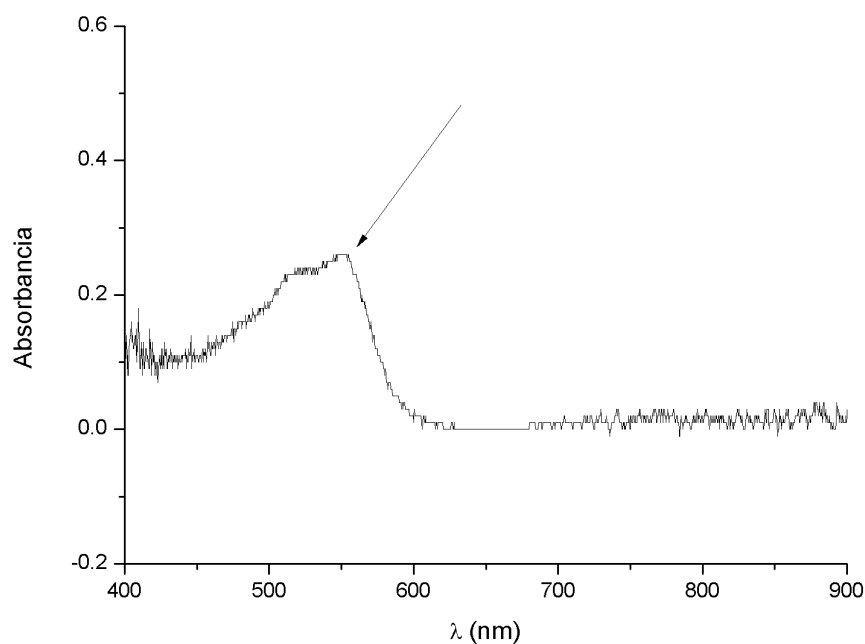


FIGURA 5.3: Espectro de absorción típico de la molécula de B12. Se señala la longitud de onda a la que ocurre la máxima absorbancia.

Apéndice A

Siglas y abreviaturas

Alg	Alginato , polímero utilizado en la síntesis del ferrogel para dotar de consistencia mecánica a éste.
B12	Vitamina B12 , vitamina hidrosoluble utilizada como fármaco inerte para los ensayos.
DM	Instrumento de medida de hipertermia magnética perteneciente a la serie DM100 de nB Nanoscale Biomagnetics, S.L..
FIB	Haz iónico focalizado , técnica de microscopía. Del inglés, <i>Focused Ion Beam</i> .
LCST	Transición crítica a bajas temperaturas . Del inglés, <i>Low Critical Solution Temperature</i> .
LRT	Teoría de respuesta lineal , modelo teórico para describir la tasa de calentamiento del coloide. Del inglés, <i>Linear Response Theory</i> .
MNP	Nanopartícula magnética . Del inglés, <i>Magnetic NanoParticle</i> .
PAA	Ácido poliacrílico , recubrimiento utilizado en la síntesis de las nanopartículas. Del inglés, <i>PolyAcrylic Acid</i> .
PNIPAM	Poli(N-isopropilacrilamida) , polímero termosensible utilizado como base del complejo polimérico.
SEM	Microscopía electrónica de barrido , técnica de microscopía. Del inglés, <i>Scanning Electron Microscopy</i> .
SPA	Absorción de potencia específica , parámetro relevante en la caracterización del coloide magnético. Del inglés, <i>Specific Power Absorption</i> .
TEM	Microscopía electrónica de transmisión , técnica de microscopía. Del inglés, <i>Transmission Electron Microscopy</i> .
VSM	Magnetómetro de muestra vibrante , instrumento utilizado para la caracterización magnética de la muestra. Del inglés, <i>Vibrating Sample Magnetometer</i> .

Referencias

- [1] Cullity, B.D., *Introduction to Magnetic Materials*. 2th ed. Series in Metallurgy and Materials, ed. Addison-Wesley. 1972.
- [2] Rosensweig, R.E., *Heating magnetic fluid with alternating magnetic field*. Journal of magnetism and magnetic materials, 2002. **252**: p. 370-374.
- [3] Martín-Palma, R.J. and A. Lakhatakia, *Nanotechnology: a crash course*. Tutorial texts in optical engineering. 2010, Bellingham, Wash.: SPIE Press. xviii, 138 p.
- [4] Goya, G.F., V. Grazu, and M.R. Ibarra, *Magnetic nanoparticles for cancer therapy*. Current Nanoscience, 2008. **4**(1): p. 1-16.
- [5] Horsman, M.R. and J. Overgaard, *Hyperthermia: a potent enhancer of radiotherapy*. Clin Oncol (R Coll Radiol), 2007. **19**(6): p. 418-26.
- [6] Zamora-Mora, V., et al., *Magnetic core-shell chitosan nanoparticles: Rheological characterization and hyperthermia application*. Carbohydrate Polymers, 2014. **102**: p. 691-698.
- [7] Goya, G.F., et al., *Magnetic hyperthermia with Fe_3O_4 nanoparticles: The influence of particle size on energy absorption*. Magnetism, IEEE Transactions on, 2008. **44**(11): p. 4444-4447.
- [8] Usov, N.A. and B.Y. Liubimov, *Dynamics of magnetic nanoparticle in a viscous liquid: Application to magnetic nanoparticle hyperthermia*. Journal of Applied Physics, 2012. **112**(2): p. 023901.
- [9] Carrey, J., B. Mehdaoui, and M. Respaud, *Simple models for dynamic hysteresis loop calculations of magnetic single-domain nanoparticles: Application to magnetic hyperthermia optimization*. Journal of Applied Physics, 2011. **109**(8): p. 083921.
- [10] Hernández, R., et al., *Magnetic Hydrogels Derived from Polysaccharides with Improved Specific Power Absorption: Potential Devices for Remotely Triggered Drug Delivery*. Journal of Physical Chemistry B, 114, 37, 12002-12007, 20.
- [11] Calatayud, M.P., et al., *The effect of surface charge of functionalized Fe_3O_4 nanoparticles on protein adsorption and cell uptake*. Biomaterials, 35(24): 6389-99, 2014.